

PENELITIAN | RESEARCH

Serotipe virus Dengue di Provinsi Aceh

Dengue virus serotype in Aceh Province

Paisal^{1*}, Reni Herman², Aya Yuriestia Arifin¹, Arie Ardiansyah², Sari Hanum¹, Khairiah¹, Mukhlis Zuardi¹, Yasir¹

¹Loka Litbang Biomedis Aceh, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Jl. Sultan Iskandar Muda Lrg. Tgk. Dilangga No. 9, Aceh Besar, 23371, Indonesia

²Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Jl. Percetakan Negara No. 23, Jakarta, 10560, Indonesia

Abstract. WHO estimated 50 million dengue infections happen every year in the world. In Indonesia, there were 90,245 DHF cases on 2012 with 816 deaths. In the Province of Aceh, 2,269 cases happened in the same year. This study aimed to identify dengue virus serotype in Aceh. Sampling was done in Kota Banda Aceh Hospital, Kota Lhokseumawe Hospital, Kabupaten Aceh Tamiang Hospital, Kabupaten Aceh Barat Hospital, and Kabupaten Simeulue Hospital between May to December 2012. This was a clinical laboratory research with observation design using cross sectional approach. Research's population was sample from patients with dengue clinical symptom. Using purposive sampling technique, we have collected 100 samples from the five hospitals (20 samples from each hospital). From RT-PCR, we found 16 positive samples (9 samples were DENV-4, 3 samples were DENV-1, 2 samples were DENV-2, and 2 samples were DENV-3).

Keywords: dengue virus, serotype, Aceh

Abstrak. WHO memperkirakan terjadi 50 juta infeksi dengue setiap tahun di seluruh dunia. Pada 2012, kasus DBD di Indonesia mencapai 90.245 kasus dengan angka kematian sebesar 816 kasus. Di Provinsi Aceh, kasus DBD pada 2012 sebesar 2269 kasus. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan serotipe virus dengue di Provinsi Aceh. Pengambilan sampel dilakukan di RS Kota Banda Aceh, RS Kota Lhokseumawe, RS Kabupaten Aceh Tamiang, RS Kabupaten Aceh Barat, dan RS Kab. Simeulue. Waktu penelitian adalah Mei 2012 sampai dengan Desember 2012. Jenis penelitian ini adalah penelitian klinis laboratoris dengan desain studi observasi menggunakan pendekatan potong lintang. Populasi penelitian adalah sampel dari semua pasien dengan gejala klinis infeksi virus dengue yang berobat di RS. Jumlah sampel adalah 100 sampel masing-masing 20 sampel per rumah sakit. Penarikan sampel dilakukan dengan teknik purposive sampling. Dari 100 sampel yang terkumpul diperoleh 16 sampel yang positif pada pemeriksaan RT-PCR, terdiri dari sembilan DENV-4, tiga sampel DENV-1, dua sampel DENV-2, dan dua sampel DENV-3.

Kata Kunci: virus dengue, serotipe, Aceh

Naskah masuk: 22 Januari 2015 | Revisi: 19 Mei 2015 | Layak terbit: 18 Juni 2015

* Korespondensi: paisal.zain@gmail.com | Telp/Faks: +62(0518)6076049/+62(0518)6076049

LATAR BELAKANG

Sekitar 2,5 milyar penduduk, atau dua perlima dari seluruh penduduk bumi berisiko terkena penyakit dengue. WHO memperkirakan terjadi 50 juta infeksi dengue di seluruh dunia setiap tahun. Sekitar 500.000 orang dengan demam berdarah dengue (DBD) membutuhkan perawatan di rumah sakit setiap tahun, dan sebagian besar adalah anak-anak. Sebanyak 2,5% diantaranya mengalami kematian. Penyakit ini telah menjadi endemis di lebih dari 100 negara di Afrika, Amerika, Asia Tenggara, dan Pasifik Barat. Negara-negara di Asia Tenggara dan Pasifik Barat adalah yang paling parah terkena.^{1,2}

Di Indonesia, DBD pertama kali dilaporkan di Jakarta dan Surabaya pada tahun 1968, 15 tahun setelah kasus pertama di Filipina. Selama wabah tersebut, ditemukan 58 kasus klinis dengan jumlah kematian 24 kasus. Tahun berikutnya kasus meningkat menjadi 167 dengan kematian 40 orang.³ Sejak saat itu, insiden demam berdarah terus meningkat dan daerah yang terkena semakin meluas.⁴ Pada tahun 2012 kasus demam berdarah dengue di Indonesia mencapai 90.245 kasus (*incidence rate* = 37,11/100.000) dengan angka kematian sebesar 816 (*case fatality rate* = 0,90).⁵ Di Provinsi Aceh, kasus demam berdarah juga tinggi. Pada tahun 2012, angka kejadian demam berdarah sebesar 2.269, dengan IR sebesar 48/100.000 dan CFR sebesar 0,3%.⁶

Secara antigenik, virus dengue dibagi menjadi empat serotipe, yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3, dan DENV-4.⁷ Keempat serotipe ini mempunyai perbedaan asam amino pada protein selubung (*envelope*) sekitar 25 sampai 40 persen dan perbedaan pada nukleotida dan asam amino genotipnya berturut-turut 6% dan 3%.⁸

Di Indonesia, pada epidemi tahun 2004 ditemukan semua serotipe. Paling banyak adalah DENV-3, diikuti DENV-4, DENV-2, dan DENV-1.⁹ Beberapa peneliti telah melakukan pemetaan serotipe virus dengue di Indonesia. Pada penelitian 2008 yang dilakukan di wilayah Pontianak, Medan, dan Jakarta ditemukan serotipe virus dengue terbanyak yaitu di Pontianak adalah DENV-3, di Medan DENV-2 diikuti DENV-3, dan di Jakarta DENV-3 diikuti DENV-1.¹⁰

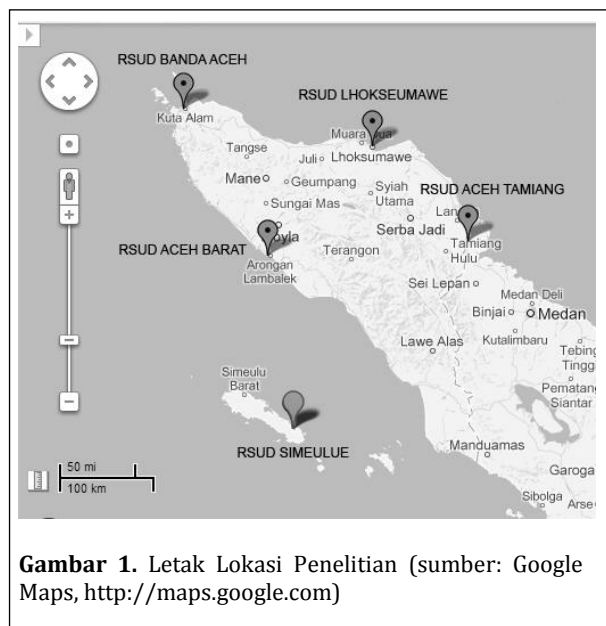
Sampai saat ini, belum ada data memadai tentang serotipe dengue yang beredar di Provinsi Aceh. Oleh karena itu, untuk melengkapi data daerah lain yang sudah ada, dilakukan penelitian untuk menentukan jenis serotipe yang bersirkulasi di Provinsi Aceh.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sirkulasi serotipe virus dengue di Provinsi Aceh selama tahun 2012. Data dari penelitian ini berguna untuk penelitian-penelitian berikutnya

terutama penelitian yang berkaitan dengan penanganan kasus infeksi dengue.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Loka Penelitian Kesehatan Aceh dan pemeriksaan sampel dilakukan di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Jakarta. Pengambilan sampel dilakukan di RS Kota Banda Aceh, RS Kota Lhokseumawe, RS Kabupaten Aceh Tamiang, RS Kabupaten Aceh Barat, dan RS Kab. Simeulue. Pemilihan RSUD didasarkan pada ditemukannya kasus penyakit DBD di kabupaten / kota terkait, selain itu didasarkan pada letak RSUD (Gambar 1), yaitu di empat sisi Provinsi Aceh dan satu kepulauan. Waktu penelitian adalah Mei 2012 sampai dengan Desember 2012.



Gambar 1. Letak Lokasi Penelitian (sumber: Google Maps, <http://maps.google.com>)

Jenis penelitian ini adalah penelitian klinis laboratoris dengan desain studi observasi menggunakan pendekatan potong lintang. Populasi penelitian adalah semua pasien dengan gejala klinis infeksi virus dengue yang berobat di RS dan memenuhi kriteria inklusi. Kriteria inklusi penelitian adalah penderita demam dengue atau demam berdarah dengue dengan gejala klinis sesuai dengan kriteria WHO 2009 yang berusia 10 – 50 tahun.¹¹ Penentuan penderita berdasarkan anamnesis dan pemeriksaan klinis oleh dokter pemeriksa. Sedangkan kriteria eksklusi adalah pasien yang tidak bersedia berpartisipasi dalam penelitian. Besar sampel ditentukan dengan menggunakan rumus dari Lemeshow pada tingkat kepercayaan 95% dan $P=95\%$ serta $d=5\%$,

hasilnya adalah 73 sampel.¹² Untuk mengantisipasi adanya kerusakan sampel sekitar 35%, maka digenapkan menjadi 100 sampel untuk kelima rumah sakit, masing-masing rumah sakit sebanyak 20 sampel. Setiap sampel dari pasien diperiksa masing-masing tanpa dilakukan *pooling*. Penarikan sampel dilakukan dengan teknik *purposive sampling*.

Skrining Pasien

Penentuan tersangka penderita infeksi dengue menggunakan kriteria WHO 2009,¹¹ yaitu jika ditemukan demam dan minimal dua gejala penyerta berikut: mual muntah, rash, nyeri atau sakit, tes tourniquet positif, leukopenia atau tanda peringatan berupa nyeri abdominal, muntah persisten, akumulasi cairan, perdarahan mukosa, letargi, pembesaran hepar >2 cm, peningkatan hematokrit bersamaan dengan penurunan trombosit secara cepat. Skrining penderita dilakukan melalui anamnesis dan pemeriksaan klinis oleh dokter rumah sakit. Pasien yang berpartisipasi dalam penelitian ini adalah mereka yang telah mendapat *informed consent* dan menandatangani dokumen Persetujuan Setelah Penjelasan (PSP). Penelitian ini juga telah disetujui oleh Komisi Etik Badan Litbang Kesehatan Kementerian Kesehatan.

Pengambilan Serum

Spesimen penelitian adalah bagian dari serum yang digunakan untuk pemeriksaan rutin pasien tersangka DBD di rumah sakit. Serum diambil oleh petugas laboratorium rumah sakit dari darah vena sekitar 5 ml pada orang dewasa dan sekitar 3 ml pada anak-anak. Sebanyak 2-3 ml digunakan untuk pemeriksaan laboratorium rutin, dan sisanya sekitar 1-2 ml digunakan untuk penelitian ini. Darah dimasukkan ke dalam tabung dan dibiarkan selama 15 menit dalam suhu ruang kemudian dimasukkan ke dalam lemari pendingin bersuhu 4°C selama 20 menit. Setelah itu disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 15 menit suhu ruang, dan didapatkan kira-kira 500-1000 µl. Serum kemudian disimpan pada suhu -20°C sampai pemeriksaan.

Pemeriksaan RT-PCR

Pemeriksaan dengan *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dilakukan di Laboratorium Nasional Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Jakarta. Isolasi RNA virus menggunakan *RNA isolation kit* (Qiagen, AS), sedangkan pemeriksaan RT-PCR mengikuti prosedur sebelumnya.¹³ Salinan cDNA dari kapsid dan prM diperoleh dengan cara amplifikasi menggunakan dua primer konsensus (D1 dan D2) yang akan menempel pada keempat jenis serotipe dengue. Setelah itu, dilakukan amplifikasi kedua dengan

empat primer spesifik (TS1, TS2, TS3, TS4) untuk masing-masing serotipe. Hasil amplifikasi kedua dianalisis menggunakan gel agarose 1% yang diwarnai dengan ethidium bromide. Interpretasi hasil elektroforesis adalah DENV-1 jika besar pita DNA 482 bp, DENV-2 119 bp, DENV-3 290 bp dan DENV-4 392 bp.

HASIL

Dari 100 orang penderita klinis infeksi dengue, ada 16 orang yang positif dalam pemeriksaan RT-PCR (Tabel 1). Rentang umur pasien yang positif RT-PCR adalah antara 10 – 38 tahun, dimana sebagian besar pasien positif adalah berusia dewasa. Sedangkan ditinjau dari jenis kelamin, dari 16 pasien positif, lebih banyak jenis kelamin perempuan, dengan perbandingan antara jenis kelamin laki-laki dan perempuan adalah 1:1,6.

Tabel 1. Karakteristik Responden Infeksi Virus Dengue di Provinsi Aceh berdasarkan pemeriksaan RT PCR Tahun 2012

Karakteristik Pasien	Total (n=16)	
	n	%
A Rumah Sakit		
1 Banda Aceh	5	31,25
2 Lhokseumawe	2	12,5
3 Aceh Tamiang	4	25
4 Simeulue	1	6,25
5 Aceh Barat	4	25
B Umur		
1 Anak/Remaja	2	12,5
2 Dewasa	14	87,5
3 Orang Tua	0	0
C Jenis Kelamin		
1 Laki-laki	6	37,5
2 Perempuan	10	62,5
D Serotipe		
1 DENV-1	3	18,75
2 DENV-2	2	12,5
3 DENV-3	2	12,5
4 DENV-4	9	56,25

Keterangan: Anak/Remaja 5-17 Dewasa 18-64 thn; Orang Tua > 64 thn.¹⁴

Dari hasil pemeriksaan RT-PCR ditemukan semua serotipe virus dengue, dimana jumlah serotipe terbanyak adalah DENV-4 (n=9), diikuti dengan DENV-1 (n=3), DENV-2 (n=2) dan 3 (n=2). Sedangkan berdasarkan lokasi penelitian, pemeriksaan positif ditemukan di semua rumah sakit dengan hasil pemeriksaan positif terbanyak adalah di RSUD Kota Banda Aceh (n=5) terdiri dari serotipe 3 dan 4, kemudian RSUD Kabupaten Aceh Tamiang (n=4) terdiri dari serotipe 1, 3,

dan 4, RSUD Kabupaten Aceh Barat (n=4) terdiri dari serotipe 1, 2, dan 4, RSUD Kota Lhokseumawe (n=2) yaitu serotipe 4, dan Simeulue (n=1) yaitu serotipe 1 (Tabel 2).

Tabel 2. Sirkulasi Serotipe Virus Dengue di Provinsi Aceh Tahun 2012

No.	Serotipe	Rumah Sakit					Total
		B	L	T	A	S	
1	DENV-1			1	1	1	3
2	DENV-2				2		2
3	DENV-3	1		1			2
4	DENV-4	4	2	2	1		9
Total		5	2	4	4	1	16

Keterangan:

B: RSUD Kota Banda Aceh; L: RSUD Kota Lhokseumawe;
T: RSUD Kab. Aceh Tamiang; A: RSUD Kab. Aceh Barat;
S: RSUD Kab. Simeulue

PEMBAHASAN

Penentuan serotipe yang beredar di suatu wilayah sangat diperlukan, baik untuk kepentingan klinis maupun kepentingan penelitian. Dari sudut pandang klinis, serotipe tertentu dapat menyebabkan penyakit dengue yang lebih berat dibanding serotipe lainnya.¹⁵ Sedangkan dari sudut penelitian, pengetahuan mengenai serotipe sangat bermanfaat untuk pengembangan metode pengobatan, diagnostik dan vaksin.

Pada penelitian ini, jumlah sampel positif RT-PCR adalah sebesar 16% (n=100) dari total sampel dari pasien yang menunjukkan infeksi dengue secara klinis. Beberapa penelitian lain memperoleh *positive predictive value* bervariasi, yaitu antara lain 36%,¹⁶ 46,1%,¹⁷ 50%.¹⁸ Rendahnya jumlah sampel positif pada penelitian ini karena skrining sampel hanya berdasarkan anamnesis dan pemeriksaan fisik oleh dokter pemeriksa. Gejala klinis infeksi dengue pada awal perjalanan penyakit biasanya tidak spesifik, menyerupai penyakit infeksi lainnya. Untuk meningkatkan kemampuan deteksi, dapat digunakan pemeriksaan skrining misalnya pemeriksaan *rapid diagnostic test* (RDT).

Pasien yang paling banyak positif pemeriksaan RT-PCR adalah pasien usia dewasa. Hal sama ditemukan juga pada penelitian lain dimana pasien yang paling banyak positif infeksi dengue berumur 32.2 ± 15.8 tahun.¹⁹ Tetapi pada penelitian lainnya jumlah pasien terbanyak adalah yang berumur di bawah 15 tahun (67,1%).²⁰

Penelitian ini juga menemukan bahwa jenis kelamin terbanyak yang positif infeksi dengue adalah perempuan dengan perbandingan 1:1,6. Hasil ini mirip dengan penelitian sebelumnya yaitu 1:1,7 dan 1,13:1.^{16,21} Tetapi penelitian lain

yang memeriksa kasus sejak 1978-2009 di Guangzhou, China menemukan jumlah kasus pada laki-laki lebih besar dibandingkan perempuan dengan perbandingan 1.15:1.²² Dari hasil penelitian tersebut terlihat bahwa kedua jenis kelamin dapat terinfeksi virus dengue dengan kemungkinan yang sama.

Dari hasil pemeriksaan RT-PCR ditemukan semua serotipe virus dengue, dimana jumlah serotipe terbanyak berturut-turut adalah DENV-4, DENV-1, DENV-2 dan DENV-3. Jumlah serotipe yang dominan cenderung berubah menurut waktu dan tempat. Penelitian oleh pada 2004 di Jakarta menemukan bahwa serotipe terbanyak adalah DENV-3, diikuti DENV-4, DENV-2, dan DENV-1.⁹ Hasil yang mirip dilaporkan juga pada 2011 dengan lokasi penelitian di Bandung yaitu serotipe terbanyak DENV-3, kemudian DENV-2, DENV-4, dan DENV-1.¹⁶ Berbeda dengan penelitian di Surabaya pada 2012 dilaporkan bahwa serotipe terbanyak adalah DENV-1, kemudian DENV-2, DENV-4, dan DENV-3.¹⁷

Berbedanya serotipe yang dominan menurut waktu tampak jelas pada penelitian 2010 di Negeri Sembilan Malaysia terjadi tiga kali pergantian serotipe dominan, yaitu mulai Januari adalah DENV-3, sekitar Mei berganti menjadi serotipe DENV-2, dan setelahnya sampai Desember serotipe dominan adalah DENV-1.¹⁹

Tidak hanya waktu dan tempat, serotipe dominan juga berbeda menurut endemisitas wilayah. Di daerah endemisitas tinggi ditemukan serotipe terbanyak adalah DENV-3, diikuti DENV-2, DENV-1, dan DENV-4. Di daerah endemisitas sedang serotipe terbanyak adalah DENV-2, diikuti DENV-3, DENV-1, dan DENV-4. Sedangkan di daerah endemis rendah hanya ditemukan dua serotipe yaitu DENV-2 dan DENV-1.¹⁸

Berubah-ubahnya serotipe dominan, baik berdasarkan waktu, tempat, maupun endemisitas mungkin disebabkan oleh sifat infeksi virus dengue. Seseorang yang telah terinfeksi salah satu serotipe akan kebal seumur hidup terhadap serotipe tersebut, tapi masih rentan terhadap serotipe lainnya.²³

Serotipe terbanyak pada penelitian ini adalah DENV-4. Sifat serotipe DENV-4 antara lain adalah memberikan gejala klinik yang lebih ringan, terutama pada orang dewasa dan durasi demam yang lebih singkat. Berbeda dengan DENV-2 yang dilaporkan dapat menyebabkan gejala klinis yang berat bahkan sering menyebabkan kematian. Sedangkan serotipe yang paling mudah menular adalah DENV-3, dan yang paling jarang adalah DENV-1.^{24,25}

Pada penelitian ini, tidak ditemukan adanya infeksi campuran antar serotipe, sama seperti dengan penelitian sebelumnya,¹⁸ tetapi beberapa penelitian lain melaporkan adanya infeksi cam-

puran, yaitu campuran DENV-2 dan DENV-3, DENV-2 dan DENV-1, serta DENV-4 dan DENV-1.^{17,25}

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa di Provinsi Aceh beredar keempat jenis serotipe virus dengue. Serotipe terbanyak adalah DENV-4, diikuti DENV-1, DENV-2, dan DENV-3.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Kepala Dinas Kesehatan dan Rumah Sakit RSUD Kota Banda Aceh, Kota Lhokseumawe, Kab. Aceh Barat, dan Kab. Simeulue atas bantuannya dalam pengambilan sampel penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- WHO. Dengue and dengue haemorrhagic fever. 2014. Available from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en>.
- Tsai JJ, Chan KS, Chang JS, Chang K, Lin CC, Huang JH, et al. Effect of serotypes on clinical manifestations of dengue fever in adults. *J Microbiol Immunol Infect*. 2009; 42(6):471-8.
- Soedarmo SP. The epidemiology, prevention and control of dengue hemorrhagic fever in Indonesia. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi*. 1994;10 Suppl:S109-12.
- Suroso T, Achmad H, Imran A. Dengue Haemorrhagic Fever Outbreaks in Indonesia 1997-1998. *Dengue Bull*. 1998;22:45-50.
- RI KK. Profil Kesehatan Indonesia 2012. Jakarta; 2012.
- Aceh DKP. Profil Kesehatan Provinsi Aceh 2012. Jakarta; 2012.
- Russell PK, Nisalak A. Dengue virus identification by the plaque reduction neutralization test. *J Immunol*. 1967; 99(2):291-6.
- Shrestha B, Brien JD, Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Edeling MA, Kim T, et al. The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. *PLoS Pathog*. 2010;6(4):e1000823.
- Suwandono A, Kosasih H, Nurhayati, Kusriastuti R, Harun S, Maroef C, et al. Four dengue virus serotypes found circulating during an outbreak of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Jakarta, Indonesia, during 2004. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006;100(9):855-62.
- Herman R, Utami BS, Tuti S, H Novriani. Sebaran serotipe virus dengue di Pontianak, Medan dan Jakarta tahun 2008. Jakarta; 2009.
- WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. New Editio. Geneva; 2009.
- Lwanga SK, Lemeshow S. Sample Size Determination in Health Studies. Geneva: World Health Organization; 1991. 1-80 p.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam A V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992; 30(3):545-51.
- Samuelson G. Global strategy on diet, physical activity and health [Internet]. *Scandinavian Journal of Nutrition*. 2004. p. 57-57. Available from: <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf> \n<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Global+Recommendations+on+physical+activity+for+health#0>
- Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Libraty DH, Green S, Rothman AL, et al. Spatial and temporal circulation of dengue virus serotypes: A prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am J Epidemiol*. 2002;156(1):52-9.
- Andriyoko B, Parwati I, Tjandrawati A, Lismayanti L. Penentuan Serotipe Virus Dengue dan Gambaran Manifestasi Klinis serta Hematologi Rutin pada Infeksi Virus Dengue Dengue Virus Serotyping and Its Clinical Manifestation and Routine Haematology in Dengue Infections. *MKB*. 2011;44(4):253-60.
- Aryati, Wardhani P, Yohan B, Aksono EB, Sasmono T. Distribusi serotipe dengue di Surabaya tahun 2012. *Indones J Clin Pathol Med Lab*. 2012;19(1):41-4.
- Prasetyowati H, Astuti EP. Serotipe Virus Dengue di Tiga Kabupaten/Kota Dengan Tingkat Endemisitas DBD Berbeda di Propinsi Jawa Barat. *Aspirator*. 2010; 2(2):120-4.
- Ahmad Nizal MG, Rozita H, Mazrura S, Zainudin MA, Hidayatulfathi O, Faridah M a., et al. Dengue infections and circulating serotypes in Negeri Sembilan, Malaysia. *Malaysian J Public Heal Med*. 2012; 12(1):21-30.
- Dutta P, Khan S, Borah J, Mahanta J. Demographic and Clinical Features of

- Patients with Dengue in Northeastern Region of India: A Retrospective Cross-Sectional Study during 2009-2011. *J Virol Microbiol.* 2012;1-11.
21. Osman O, Fong MY, Devi S. Short Communication A Preliminary Study of Dengue Infection in Brunei. *Jpn J Infect Dis.* 2007;60:205-8.
 22. Luo L, Liang H, Hu Y, Liu W, Wang Y, Jing Q, et al. Epidemiological, Virological, and Entomological Characteristics of Dengue from 1978 to 2009 in Guangzhou, China Epidemiological, virological, and entomological characteristics of dengue from 1978 to 2009 in Guangzhou, China. 2012; 37(1):230-40.
 23. Nielsen DG. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. *Virol J.* 2009;6:211.
 24. Nishiura H, Halstead SB. Natural history of dengue virus (DENV)-1 and DENV-4 infections: reanalysis of classic studies. *J Infect Dis.* 2007;195(7):1007-13.
 25. Rantam FA, Purwati AN, Sasmono T, Lee D, Eryk H, Helen S, et al. Serotype infectivity and phylogenetic of dengue virus cause of dengue fever (DF), dengue hemorrhagic fever (DHF), and Dengue shock syndrome (DSS) in surabaya- Indonesia. *African J Intern Med.* 2013;1(5):31-6.